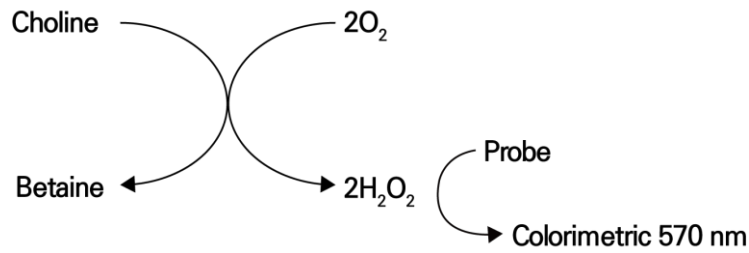


Picrosses™ Acetylcholinesterase Activity Assay Kit

(Colorimetric)

BM-ACH-100, 100 Assays

제품 원리



BIOMAX PicoSens™ Acetylcholinesterase Activity Assay Kit (Colorimetric)에서 Acetylcholinesterase (AChE) Acetylcholine 기질을 Choline으로 전환시키고 이는 Choline oxidase에 의해 산화되어 H₂O₂를 생성합니다. 생성된 H₂O₂가 Probe와 반응하여 흡광도 570 nm에서 측정되며, 이를 통해 Sample의 AChE Activity를 확인할 수 있습니다.

제품의 구성 및 보관 조건

Components	Size	Storage
AChE Assay Buffer	25 ml	-20°C
AChE Enzyme Mix (Lyophilized)	1 vial	
AChE Substrate (Lyophilized)	5 vials	
AChE Probe	200 µl	
AChE Standard (50 mM)	100 µl	

* 개봉하지 않은 제품은 빛을 차단한 상태에서 -20°C 보관 시 1년간 안정적입니다.

검사 필요 장비 및 소모품

- ▶ 96-well Microplate (Clear, Flat bottom)
- ▶ Pipette & Sterile tips
- ▶ Dimethyl sulfoxide (DMSO)
- ▶ Colorimetric microplate reader (570 nm filter)

실험 전 준비 사항 및 보관 방법

- 제품의 모든 구성품은 상온에서 놔두어 완전히 녹인 후 사용합니다.
- Vial 뚜껑 내부에 시약이 묻어 있을 수 있으니 개봉 전 원심 분리합니다.

AChE Assay Buffer

사용 후 4 °C 또는 -20 °C에 보관합니다.

AChE Enzyme Mix

AChE Assay Buffer 220 μ l를 넣고 녹입니다. 사용 후 -20 °C에 보관할 수 있으며 2개월 이내에 사용합니다.

AChE Probe

사용 후 -20 °C에 보관할 수 있으며 2개월 이내에 사용합니다.

AChE Standard

사용 후 -20 °C에 보관할 수 있으며 2개월 이내에 사용합니다.

Sample type

- Serum, Plasma or Blood
- Animal tissues: Liver, Heart, Kidney etc.
- Cell culture : Adherent or Suspension cells

Sample preparation

Tissus / Cell pellet

- ① 25 mg의 Sample (Tissues 또는 Cell pellet)에 Extraction buffer (ex. PBS)을 넣고 Homogenization을 합니다.

* Enzyme의 활성을 막는 Denaturing reagent가 포함된 RIPA Lysis solution 등은 사용이 불가하며, pH 7~8 정도의 차가운 Buffer를 이용하여 Homogenization 해줍니다.

- ② 충분히 파쇄된 것을 확인한 후 10,000 x g로 5 min 간 Centrifuge합니다. Supernatant를 새로운 Microtube로 옮깁니다.

Standard preparation

50 mM AChE Standard 10 μ l와 AChE Assay Buffer 990 μ l를 혼합하여 0.5 mM Standard solution을 만들어 아래 표와 같이 만듭니다.

STD No.	Vol. of 0.5 mM STD Solution (μ l) *	Assay Buffer (μ l) *	Final STD Vol. in well (μ l/well)	Final STD Amount in well (μ g/well)
Blank	0	50	50	0
2	2	48	50	1
3	4	46	50	2
4	6	44	50	3
5	8	42	50	4
6	10	40	50	5

* Single test 기준입니다. Duplicate 또는 Triplicate 이상을 권장합니다.

실험 과정

- * 미지의 Sample 또는 처음 측정하는 Sample의 경우 측정값이 Standard curve 내에 위치하도록 예비실험 진행한 후 사용을 권장합니다.
- * Sample의 측정 값이 높은 Background 값을 가지면 측정에 사용한 동일 양의 Sample을 Background control로 준비합니다.
- * Standard는 실험할 때마다 Standard solution으로 희석하여 사용하며 희석한 Standard solution은 재사용하지 마십시오.

① AChE Substrate 1 vial에 DMSO 1 ml를 첨가하여 완전히 녹여 Substrate solution을 준비합니다.

* 제공되는 AChE Substrate는 재사용하지 않고 실험 시마다 DMSO로 녹여서 사용합니다.

② 준비된 Sample 2~50 μ l를 96-well Microplate에 분주 후 최종 Well 당 Volume은 AChE Assay Buffer로 50 μ l가 되도록 조정합니다.

③ 준비된 Standard solution을 각 Well에 50 μ l씩 분주합니다.

④ Reaction mix를 아래와 같이 만들어 준비합니다.

* 높은 Background를 갖는 Sample의 경우 Background control mix를 준비합니다.

Kit components (Colorimetric)	Mix	
	Reaction (50 μ l/well)	Background Control (50 μ l/well)
Assay Buffer	45 μ l	46 μ l
Enzyme Mix	2 μ l	2 μ l
Substrate Solution	1 μ l	- μ l
Probe	2 μ l	2 μ l

* 50 μ l/well 기준으로 Sample과 Standard well 수를 고려하되 총 소요량보다 약 10% 많은 Reaction mix를 준비합니다. (사용 전 Spin-down)

⑤ Sample과 Standard solution을 분주한 Well에 혼합한 Reaction mix를 50 μ l씩 분주합니다.

* 높은 Background를 갖는 Sample의 경우 준비한 Background control well에 Background control mix 50 μ l를 분주합니다.

(Total reaction volume : 100 μ l)

⑥ 빛을 차단하여 37°C에서 30 min 동안 Kinetic mode에서 Microplate reader로 흡광도 570 nm에서 측정합니다.

* 적정 Incubation time은 Sample 내의 AChE의 활성에 따라 다를 수 있습니다. 정확한 측정을 위해 Kinetic mode에서 OD값을 측정합니다.

결과 분석

- 각 Standard well과 Sample well의 Duplicate 또는 Triplicate 측정값의 평균값을 구합니다.
- 모든 측정값에서 Blank 값을 뺍니다.
* Sample background control을 설정한 경우 Sample의 측정값에서 Sample background control 측정값과 Blank 측정 값을 모두 빼줍니다.
- Kinetic mode에서 OD값을 측정했을 때 그래프가 직선구간을 이루는 범위에서 두 Time point(T_1 과 T_2)를 선택합니다. ($\Delta T = T_2 - T_1$)
- 이때의 OD값을 각각 A_1 과 A_2 라고 합니다. ($\Delta OD = A_2 - A_1$)
- Standard curve는 T_2 시점에서 Endpoint mode로 작성하고 여기에 ΔOD 값을 적용하여 해당시간 동안 생성된 Choline의 양 (B nmol)을 구합니다.
- Standard curve를 통해 반응에서 생산된 Choline의 양을 계산하고 Kinetic assay에서 구한 Time point와 OD값을 통해 아래와 같이 AChE의 활성을 구합니다.

$$AChE \text{ Activity}(\text{nmol/min/ml or mU/ml}) = B / (\Delta T \times V) \times D$$

B : Standard curve 에서 구한 Choline 의 양 (nmol)

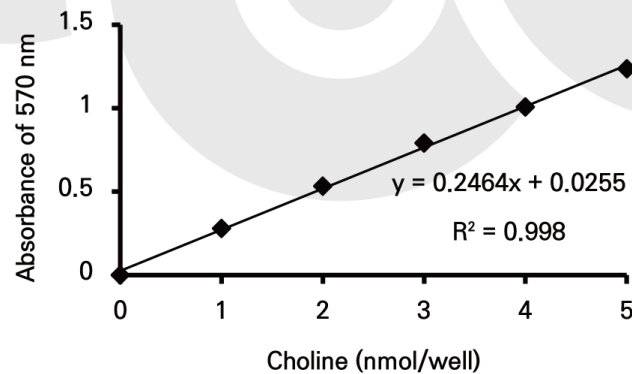
ΔT : Reaction Time ($\Delta T = T_2 - T_1$, min)

V : Well 에 분주한 Sample 의 Volume (ml)

D : Sample 희석 배율

- 위 결과 값을 바탕으로 AChE 활성은 다음과 같이 정의됩니다.

AChE 1 unit = 37 °C, pH 7.4 에서 1 min 당 1.0 nmol 의 Choline 을 생성하는 AChE 의 양



Choline standard curve

Related products

- BM-ETH-100

PicoSens™ Ethanol Assay Kit (Colorimetric)

** 안전한 사용을 위해 유해물질 정보는 MSDS를 참조하십시오.*Homepage : www.biomax.comShopping mall : www.biomaxmall.comE-mail : info@scgbiomax.com

Tel : 02-3296-3158 / Fax : 02-973-2858

(주) 바이오맥스 : 경기 구리시 갈매순환로166번길 46, 금강펜테리움 IX타워 CORE-C, 7층

Note